

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 16/00, G01N 33/53</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/26963 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. September 1996 (06.09.96)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE96/00369 (22) Internationales Anmeldedatum: 1. März 1996 (01.03.96) (30) Prioritätsdaten: 195 07 166.2 1. März 1995 (01.03.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZENTGRAF, Hanswalter [DE/DE]; Bluntschlistrasse 6, D-69115 Heidelberg (DE). TESSMER, Claudia [DE/DE]; Höhenstrasse 23, D-74869 Schwarzach (DE). VELHAGEN, Iris [DE/DE]; Goestrasse 14, D-68723 Schwetzingen (DE). SCHWINN, Susanne [DE/DE]; Robert-Bosch-Strasse 14, D-68766 Hockenheim (DE). FREY, Manfred [DE/DE]; Lessingstrasse 12, D-68259 Mannheim (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.</p>
<p>(54) Title: ANTIBODIES ACTIVE AGAINST A FUSION POLYPEPTIDE COMPRISING A HISTIDINE PORTION (54) Bezeichnung: ANTIKÖRPER GEGEN EIN, EINEN HISTIDIN-ANTEIL AUFWEISENDES FUSIONSPOLYPEPTID (57) Abstract The present invention concerns antibodies which are active against a fusion polypeptide comprising a histidine portion, a process for their preparation and their use. (57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.</p>		

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
61920 Heidelberg

Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Es ist bekannt, ein Polypeptid in Form eines Histidin-Fusionspolypeptids zu exprimieren. In einem solchen liegt ein Histidin-Anteil von z.B. 6-18 aufeinander folgenden Histidinresten fusioniert am C- oder N-Terminus des Polypeptids vor. Damit ist es möglich, das Histidin-Fusionspolypeptid mittels einer Nickel-Chelat-Chromatographiesäule aus dem Überstand oder Zellysat der es exprimierenden Zelle zu isolieren.

Vorstehende Säule ist aber teuer. Ferner bedeutet ihr Einsatz einen großen Zeitaufwand. Daher eignet sie sich nicht zum schnellen Nachweis der Expression eines Histidin-Fusionspolypeptids. Ein solcher Nachweis ist aber von Nöten, insbesondere, wenn er zum Screening vieler Zellen herangezogen werden soll.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem die Expression eines Histidin-Fusionspolypeptids schnell nachgewiesen werden kann.

Erfindungsgemäß wird dies durch einen Antikörper erreicht, der gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid gerichtet ist.

Ein solcher Antikörper kann ein polyklonaler oder monoklonaler Antikörper sein, wobei ein monoklonaler Antikörper bevorzugt ist. Der Antikörper kann aus jegli-

chem Tier oder dem Menschen erhalten sein, wobei für einen polyklonalen Antikörper Kaninchen und für einen monoklonalen Mäuse bevorzugt sind.

Ferner kann der Antikörper synthetisch sein, wobei ihm ggfs. Teile, die für vorstehende Erkennung nicht notwendig sind, ganz oder teilweise fehlen bzw. diese Teile durch andere ersetzt sind, die dem Antikörper weitere günstige Eigenschaften verleihen.

Der Ausdruck "Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid" umfaßt ein Polypeptid (Peptid) jeglicher Art und Länge, das einen Histidin-Anteil aufweist. Ein solches Polypeptid kann von jeglichen Zellen, z.B. Bakterien, Hefen, Insekten-, Pflanzen- und tierischen Zellen, sowie Organismen, z.B. transgenen Tieren, exprimiert sein. Ein vorstehender Histidin-Anteil kann z.B. 6-18, vorzugsweise 6 aufeinander folgende Histidinreste umfassen und fusioniert am N und/oder C-Terminus des Polypeptids vorliegen.

Ein bevorzugter Antikörper der vorliegenden Erfindung, nämlich ein monoklonaler Maus-Antikörper mit vorstehender Erkennung, wurde bei der DSM unter der Nummer ACC 2207 am 15. Febr. 1995 hinterlegt.

Erfindungsgemäße Antikörper können nach üblichen Verfahren hergestellt werden. Sollen polyklonale bzw. monoklonale Antikörper hergestellt werden, ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen für erstere und Mäuse für letztere Antikörper, mit einem vorstehenden Histidin-Fusionspolypeptid, z.B. His p53 (vgl. deutsche Patentanmeldung P 42 32 823.3) oder His hdm2 (vgl. deutsche Patentanmeldung P 43 39 553.3), vorzugsweise einem Gemisch aus solchen zu immunisieren. Weiteres Boostern der Tiere kann mit dem oder den gleichen Histidin-Fusionspolypeptiden erfolgen. Auch können andere Histidin-Fusionspolypeptide oder eine Kombination aus diesen und dem oder den vorhergehenden Histidin-Fusionspolypeptiden zum Boostern verwendet werden. Die polyklonalen Antikörper können dann aus dem Serum der Tiere erhalten werden. Für die monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Zur Herstellung von synthetischen Antikörpern kann z.B. von vorstehend erhaltenen, monoklonalen Antikörpern ausgegangen werden. Hierzu bietet sich an, die Antigen-Bindungsregionen der monoklonalen Antikörper zu analysieren und die für vorstehende Erkennung notwendigen und nicht notwendigen Teile zu identifizieren. Die notwendigen Teile können dann modifiziert und die nicht notwendigen ganz oder teilweise eliminiert bzw. durch Teile ersetzt werden, die den Antikörpern weitere günstige Eigenschaften verleihen. Auch können Teile außerhalb der Bindungsregionen der Antikörper modifiziert, eliminiert oder ersetzt werden. Der Fachmann weiß, daß sich für vorstehende Maßnahmen insbesondere die DNA-Rekombinationstechnologie eignet. Diese ist ihm bestens vertraut.

Erfindungsgemäße Antikörper zeichnen sich dadurch aus, daß sie beliebige Fusionspolypeptide erkennen, die einen Histidin-Anteil aufweisen. Die Antikörper eignen sich daher zum schnellen Nachweis der Expression solcher Fusionspolypeptide. Dies kann in beliebigen Nachweisverfahren, insbesondere in einem Western Blot, einem ELISA, einer Immunpräzipitation oder einer Immunfluoreszenz, erfolgen. Hierzu können die erfindungsgemäßen Antikörper, wenn es angebracht ist, markiert sein oder in Kombination mit markierten gegen sie gerichteten Antikörpern eingesetzt werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung von monoklonalen Antikörpern

Zur Immunisierung wurden Mäuse verwendet. Als Antigene wurden His hdm2 (Aminosäure 1-284), His hdm2 (Aminosäure 58-491) und His p53 (Aminosäure 66-393) (vgl. vorstehend) verwendet. Diese waren in einem Puffer aus 8 M Harnstoff, 100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-HCl gelöst.

Immunisierungs- und Boosterschema:

Tag 1: 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)
 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)
 50 μ l PBS (Phosphat-gepufferte Saline)
 150 μ l Freund's Adjuvans komplett

300 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in eine Maus injiziert

Tag 30: 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)
 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)
 20 μ l PBS
 120 μ l Freund's Adjuvans inkomplett

240 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 60: 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)
 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)
 85 μ l PBS
 115 μ l Freund's Adjuvans inkomplett

300 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 90: 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)
 50 μ l (= 10 μ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)
 200 μ l PBS

300 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 180: 150 μ l (= 20 μ g) His p53 (Aminosäure 66-393)
 150 μ l Freund's Adjuvans komplett

300 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 230: 75 μ l (= 10 μ g) His p53 (Aminosäure 66-393)
 25 μ l (= 5 μ g) His hdm2 (Aminosäure 1-284)
 25 μ l (= 5 μ g) His hdm2 (Aminosäure 58-491)
 125 μ l Freund's Adjuvans inkomplett

250 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Tag 260: 75 μ l (= 10 μ g) His p53 (Aminosäure 66-393)
 25 μ l (= 5 μ g) His hdm 2 (Aminosäure 1-284)
 25 μ l (= 5 μ g) His hdm 2 (Aminosäure 58-491)
 125 μ l PBS

250 μ l Mix

200 μ l des Mix wurden in vorstehende Maus injiziert.

Am Tag 262 wurde die Maus getötet. Milzzellen wurden ihr entnommen und mit Myelomzellen fusioniert. Es wurden monoklonale Antikörper erhalten. Einer dieser wurde bei der DSM unter ACC 2207 am 15. Febr. 1995 hinterlegt.

Beispiel 2: Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Zur Immunisierung wurden Kaninchen verwendet. Es wurden die Antigene von Beispiel 1 verwendet. Das Immunisierung- und Boosterschema war identisch mit jenem von Beispiel 1 bis einschließlich Tag 90.

Tag 92: Aus der Ohrvene des Kaninchens wurden 5 ml Blut entnommen und in einem ELISA bzw. Western-Blot auf Antikörper-Aktivität getestet.

Tag 93: Nach positivem Test am Tag 92, wurden die Tiere getötet und die Antikörper aus dem Serum gewonnen.

Beispiel 3: Nachweis von Histidin-Fusionspolypeptiden durch erfindungsgemäße Antikörper

(a) Western-Blot

Histidin-Fusionspolypeptide, nämlich His hdm2 (Aminosäure 1-284), His hdm2 (Aminosäure 58-491) und His p53 (Aminosäure 66-393) von Beispiel 1, sowie die Polypeptide hdm2 (Aminosäure 1-284), WAF 1 (= wildtyp aktivierender Faktor) und t16 (= zell. regulierendes Protein) als Kontrolle wurden einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Das Gel wurde über Nacht auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese wurde dann mit vorstehendem, 1:10 bzw. 1:50 verdünnten Antikörper ACC 2207 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten mit PBS (0,05 % Tween 20) wurde ein käuflicher alkalischer Phosphatase-gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper (Verdünnung nach Angabe

der Hersteller) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschrirte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit alkalischer Phosphatase mit Entwicklerlösung (36 μ M 5'-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 μ M Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$) bei Raumtemperatur bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Antikörper ACC 2207 spezifisch Histidin-Fusionspolypeptide, nicht aber Polypeptide ohne Histidin-Anteil erkennt.

(b) ELISA

In eine 96-Loch-Platte wurden pro Loch je 100 μ l mit 20 ng bzw. 8 ng der Histidin-Fusionspolypeptide bzw. der Kontrollen von (a) einpipettiert. Nach Inkubation über Nacht bei 4°C schlossen sich 3 kurze Waschschrirte mit PBS an. Anschließend erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen des polymeren Trägers durch einstündige Inkubation mit 1 % BSA in PBS bei 37°C. Der erfindungsgemäße, 1:10 bzw. 1:50 verdünnte Antikörper ACC 2207 wurde 1 Stunde bei 37°C auf der Platte inkubiert. Nach 8 Waschschrirten mit PBS wurde der Peroxidase-gekoppelte Ziege anti-Maus Antikörper von (a) zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten 8 Waschschrirte und anschließend die Peroxidase-Nachweisreaktion mit Entwicklungslösung (50 mM Natriumacetat, 0,4 mM 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid, 4,4 mM H_2O_2) bei Raumtemperatur bis Banden sichtbar waren.

Es zeigte sich, daß der erfindungsgemäße Antikörper ACC 2207 spezifisch Histidin-Fusionspolypeptide, nicht aber ein Polypeptid ohne Histidin-Anteil erkennt.

K 2316

Patentansprüche

1. Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er polyklonal ist.
3. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter ACC 2207 hinterlegt ist.
5. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tier mit einem Histidin-Fusionspolypeptid immunisiert wird, und
 - (a) polyklonale Antikörper aus dem Serum des Tieres erhalten werden, oder
 - (b) monoklonale Antikörper nach Fusion von Milzzellen des Tieres mit Myelomzellen erhalten werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von Histidin-Fusionspolypeptiden zur Immunisierung eingesetzt wird.
7. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4 in einem Nachweisverfahren für ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Nachweisverfahren ein Western-Blot, ein ELISA, eine Immunfluoreszenz oder eine Immunpräzipitation ist.

K 2316

Zusammenfassung

Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid

Die vorliegende Erfindung betrifft Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung.

Patentansprüche

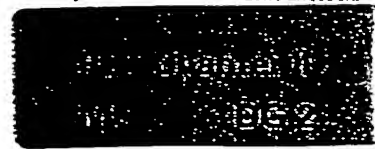
1. Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid, wobei der Antikörper gegen den Histidin-Anteil gerichtet ist und dieser 6-18 Histidinreste umfaßt.
2. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er polyklonal ist.
3. Antikörper nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.
4. Antikörper nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß er bei der DSM unter ACC 2207 hinterlegt ist.
5. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tier mit einem Histidin-Fusionspolypeptid immunisiert wird, und
 - (a) polyklonale Antikörper aus dem Serum des Tieres erhalten werden, oder
 - (b) monoklonale Antikörper nach Fusion von Milzzellen des Tieres mit Myelomzellen erhalten werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch von Histidin-Fusionspolypeptiden zur Immunisierung eingesetzt wird.
7. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1-4 in einem Nachweisverfahren für ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid.
8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei das Nachweisverfahren ein Western-

Blot, ein ELISA, eine Immunfluoreszenz oder eine Immunpräzipitation ist.

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT



ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen	
Bezeichnung der IPEA	Eingangsdatum des ANTRAGS

Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG		Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2316 - hu / msl
Internationales Aktenzeichen PCT/DE96/00369	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01 March 1996 (01.03.96)	(Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 01 March 1995 (01.03.95)
Bezeichnung der Erfindung Antikörper gegen ein, einen Histidin-Anteil aufweisendes Fusionspolypeptid		
Feld Nr. II ANMELDER		
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)</small> Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 D-69120 Heidelberg		Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreibnr.:
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)</small> Zentgraf, Hanswalter Bluntschlistraße 6 D-69115 Heidelberg		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	
Name und Anschrift: <small>(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)</small> Tessmer, Claudia Höhenstraße 23 D-74869 Schwarzach		
Staatsangehörigkeit (Staat): DE	Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE	

Fortsetzung von Feld Nr. II ANMELDER

Wird keines der folgenden Felder benutzt, so ist dieses Blatt dem Antrag nicht beizufügen.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Velhagen Iris
Goestraße 14
D-68723 Schwetzingen

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Schwinn, Susanne
Robert-Bosch-Straße 14
D-68766 Hockenheim

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Frey, Manfred
Lessingstraße 12
D-68259 Mannheim

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

☐

Weitere Anmelder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER: ZUSTELLANSCHRIFT

- Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
- und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
- ☐ wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
- ☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

Patentanwälte
Huber & Schübler
Truderinger Straße 246

81825 München

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

- ☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde:

- i) ☐ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
- ☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
 - ☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
- berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

- ☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten (das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind) ausgenommen

(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)

Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|---|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | | |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln aufführen): | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input type="checkbox"/> sonstige (einzeln aufführen): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

30. September 1996

Dr. BERNHARD HUBER
Patentanwalt

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b): | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum: Punkt 4 und Punkt 5. unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**


PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2316 hu/msl	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 96/ 00369	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 01/03/1996	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 01/03/1995
Internationale Parentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C07K16/00		
Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM et al.		

1.	Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2.	Dieser BERICHT umfaßt insgesamt <u>4</u> Blätter einschließlich dieses Deckblatts. <input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT) Diese Anlagen umfassen insgesamt <u>2</u> Blätter.
3.	Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten: I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 30/09/1996	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 30.05.97
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. (+ 49-89) 2399-0, Tx: 523656 epmu d Fax: (+ 49-89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter W. Linker W. Linker

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.)

☐ der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung.

☒ der Beschreibung, Seite/n 1-7 _____; in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Seite/n _____, eingereicht mit dem Antrag.

Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

Seite/n _____, eingereicht mit Schreiben vom _____

☒ der Ansprüche, Nr. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Nr. _____, in der nach Artikel 19 geänderten Fassung.

Nr. _____, eingereicht mit dem Antrag.

Nr. 1-8 _____, eingereicht mit Schreiben vom 11.04.97.

Nr. _____, eingereicht mit Schreiben vom _____.

☐ der Zeichnungen, Blatt/Abb. _____, in der ursprünglich eingereichten Fassung.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit dem Antrag.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben
vom _____.

Blatt/Abb. _____, eingereicht mit Schreiben
vom _____.

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

☐ Beschreibung: Seite _____.

☐ Ansprüche: Nr. _____.

☐ Zeichnungen: Blatt/Abb. _____.

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2 c)).

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:
-

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erläuterungen zur Stützung dieser Feststellung

1. FESTSTELLUNG

Neuheit	Ansprüche 1-8 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN
Erfinderische Tätigkeit	Ansprüche 1-8 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN
Gewerbliche Anwendbarkeit	Ansprüche 1-8 _____	JA
	Ansprüche _____	NEIN

2. UNTERLAGEN UND ERLÄUTERUNGEN

1. Das folgende im Recherchenbericht zitierte Dokument ist in diesem Bericht berücksichtigt worden:

D1: D.B. EVANS et al. (1992), J. of Immunological
Methods 156, 231-238

2. Die Gegenstände der Ansprüche 1-8 sind aus dem ermittelten Stand der Technik weder bekannt, noch werden sie durch ihn nahegelegt. Die beanspruchte Erfindung erfüllt daher die in Artikel 33 (2) und (3) genannten Kriterien.
3. Aus dem nächstliegenden Stand der Technik (D1) sind Antikörper bekannt, die den metallbindenden Peptidanteil (His-Asp-His-Asp-His-) eines Fusionsproteins erkennen. Die beanspruchten Antikörper unterscheiden sich hiervon dadurch, daß sie gegen den 6-18 Histidinreste umfassenden Histidinanteil eines entsprechenden
- Fusionspolypeptids gerichtet sind. Die erfindungsgemäßen Antikörper können zum Nachweis der Expression von Histidin-Fusionspolypeptiden verwendet werden.

VII. Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

Es wurde festgestellt, daß die internationale Anmeldung nach Form oder Inhalt folgende Mängel aufweist:

1. Die Dokumente:

A.G. CAMPBELL AND D.S. RAY (1993), Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 90, 9350-9354

T.J. PEDERSEN AND L. HANLEY-BOWDOIN (1994),
Virology 202, 1070-1075

A.H. PATEL AND J.B. MACLEAN (1995),
Virology 206, 465-478

D.B. EVANS et al. (1992), J. of Immunological
Methods 156, 231-238

wurden in der Beschreibung nicht angegeben; auch der
darin enthaltene einschlägige Stand der Technik wurde
nicht kurz umrissen. Die Erfordernisse der Regel
5.1(a)(ii) PCT sind somit nicht erfüllt.